

(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

## KOREAN PATENT ABSTRACTS

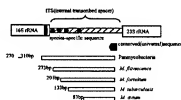
(11)Publication number: 1020020021453 A  
(43)Date of publication of application: 21.03.2002(21)Application number: 1020000054166  
(22)Date of filing: 15.09.2000(71)Applicant: KIM, CHEOL MIN  
PARK, HEE KYUNG  
SJHIGHTECH CO., LTD.  
(72)Inventor: JANG, HYEON JEONG  
KIM, CHEOL MIN  
PARK, HEE KYUNG  
PARK, HYEON SUK  
SONG, EUN SIL

(51)Int. Cl. C12Q 1/68

(54) MULTIPLEX PCR METHOD, KIT AND OLIGONUCLEOTIDE FOR IDENTIFYING MYCOBACTERIA USING THE SAME

(57) Abstract:

**PURPOSE:** Provided are a multiplex PCR method and a kit and an oligonucleotide for identifying Mycobacteria using the multiplex PCR, thereby determining whether a bacterium belongs to Mycobacterium sp. or not, and simultaneously detecting 4 kinds of Mycobacteria, *M.tuberculosis*, *M.fortuitum*, *M.flavescens* and *M.avium*. **CONSTITUTION:** The multiplex PCR method comprises: preparing a fixed primer by using at least one oligonucleotide of SEQ ID NO:1 having common nucleotide sequence of at least two target genes to be amplified; preparing specific primers by using at least two oligonucleotides of SEQ ID NO:2-6 having specific nucleotide sequences of the target genes; and reacting the fixed primer and the specific primers in a reactor to amplify at least two target genes.



copyright KIPO 2002

## Legal Status

Date of request for an examination (20000915)  
 Notification date of refusal decision (00000000)  
 Final disposal of an application (registration)  
 Date of final disposal of an application (20040220)  
 Patent registration number (1004332600000)  
 Date of registration (20040517)

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. <sup>7</sup>  
C12Q 1/68

(11) 공개번호 특2002-0021453  
(43) 공개일자 2002년03월21일

(21) 출원번호 10-2000-0054166  
(22) 출원일자 2000년09월15일

(71) 출원인 주식회사 에스제이하이테크  
김정준  
부산 부산진구 범천1동 849-2  
김철민  
부산 수영구 남천2동 148번지 삼익비치아파트 211-811  
박희경  
서울 성북구 성북2동 60-1

(72) 발명자 박희경  
서울 성북구 성북2동 60-1  
박현숙  
부산광역시금정구장전1동366-35  
장현정  
부산광역시해운대구좌동대원(아)102-801  
송은실  
부산광역시남구문현4동1026-105동3반  
김철민  
부산 수영구 남천2동 148번지 삼익비치아파트 211-811

(74) 대리인 이영필

심사청구 : 있음

(54) 멀티플렉스 P C R 방법 및 이를 이용한 마이코박테리아동정용 키트 및 올리고 뉴클레오타이드

요약

본 발명은 신규한 멀티플렉스(multiplex) PCR 방법, 및 이를 이용하여 마이코박테리아 각 균종을 특이적이고 신속하게 동정하기 위한 멀티플렉스 PCR용 키트 및 올리고뉴클레오타이드에 관한 것으로, 중폭하고자 하는 2 종 이상의 표적 유전자에서 공통적인 염기서열을 갖는 1 개 이상의 올리고뉴클레오타이드를 고정 프라이머로 하고, 표적 유전자에서 특이적인 염기서열을 갖는 2 종 이상의 올리고뉴클레오타이드를 특이적 프라이머로 하여, 상기 고정 프라이머와 특이적 프라이머를 하나의 용기 내에서 동시에 반응시켜 2 종 이상의 표적 유전자를 중폭시키는 것을 특징으로 하는 멀티플렉스 P C R 방법; 및 상기 멀티플렉스 PCR 방법에서 고정 프라이머를 마이코박테리아 속에 공통적인 염기서열을 갖는 올리고

뉴클레오타이드 프라이머로 하고, 특이적 프라이머를 마이코박테리아 각각의 균종에 특이적인 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드 프라이머로 하는 본 발명의 멀티플렉스 PCR용 키트를 사용하면, 단 1 회의 PCR 수행으로 2 종 이상의 균종을 포함한 균주에 대해서도 확인이 가능하므로 결핵 감염의 진단에 효과적으로 활용될 수 있으며, 그 밖의 비결핵균 (NTM)을 검출하는 데에 효과적이면서도 경제적으로 사용될 수 있을 것이다.

대표도

도 1

색인어

멀티플렉스 PCR, 마이코박테리아, 비결핵마이코박테리아, 동정, ITS.

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 멀티플렉스 PCR에 사용되는 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 위치 및 PCR 증폭 산물의 지도를 나타내는 개요도,

도 2는 마이코박테리아 속에만 특이적으로 존재하는 염기서열의 프라이머 ITSF와 MYC6를 사용하여 PCR을 실시한 후 전기영동한 사진,

도 3은 마이코박테리아 각 균종마다 특이적으로 존재하는 염기서열의 균주 특이적 프라이머 MTB10, FOR12, FLA9 및 MAC5를 사용하여 PCR을 실시한 후 전기영동한 사진,

도 4는 본 발명의 프라이머 ITSF, MTB10, FOR12, FLA9, MAC5 및 MYC6를 사용하여, 결핵균 및 6 종의 비결핵균 (NTM)에 대하여 멀티플렉스 PCR을 실시한 후 전기영동한 사진,

도 5는 도 4의 전기영동 사진을 도식화한 것.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 신규한 멀티플렉스(multiplex) PCR 방법, 및 이를 이용하여 마이코박테리아 각 균종을 특이적이고 신속하게 동정하기 위한 멀티플렉스 PCR용 키트 및 올리고뉴클레오타이드에 관한 것으로, 상세하게는 마이코박테리아의 ITS(internal transcribed spacer) 염기서열에서 고안한 속 특이적(genus-specific) 프라이머와 종 특이적(species-specific) 프라이머를 이용하여 1 회의 PCR로 마이코박테리아 속을 검정하고 결핵균과 비결핵균(NTM) 4 균종을 동시에 검출할 수 있도록 하는 멀티플렉스 PCR 방법에 관련된다.

마이코박테리아는 인간에게 질병을 일으키는 중요한 병원성 인자의 하나로, 매년 전세계적으로 8백만 명이 마이코박테리아 속의 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)에 감염되며 3백만 명 이상의 사망자가 발생하고 있다(Raviglione, M. C., D. E. Snider, 및 A. Kochi. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. JAMA, 273: 220 - 226(1995)). 최근에는 ADIS 환자가 급속히 확산됨에 따라 결핵균 이외의 비결핵 마이코박테리아 (NTM: non-tuberculosis mycobacteria) 균종에 의한 감염증이 점차 증가하고 있다 (Barnes, P., A. B. Bloch, P. T. Davidson, 및 D. E. Snider, Jr. Tuberculosis in patients with immunodeficiency virus infection. N. Engl. J. Med, 324: 1644 - 1650(1991)). 이와 같은 이유로, 결핵균 뿐만 아니라 비결핵 마이코박테리아도 신속하면서도 효율적으로 동정 및 진단하는 방법을 개발할 것이 절실히 요구되고 있다.

균을 동정하고 분류하기 위한 이전의 방법들은 균의 형태학적, 생화학적, 그리고 생장 특성에 근거하고 있다. 이러한 방법들은 번거롭고 복잡하며, 장시간이 소요된다는 등의 문제점들이 있다. 최근에는 유전자를 표적으로 하는 빠르면서도 보다 간편한 방법들이 점차 많이 사용되고, 또 새롭게 개발되고 있는데, 이 방법에서는 특정 유전자를 대상으로 속 특이적 (genus-specific) 혹은 균종 특이적 (species-specific) PCR 프라이머나 핵산 프로브 등을 이용하고 있다.

이러한 배경 하에서 균종 감별의 근거를 제공할 수 있는 마이코박테리아의 계통분석은 16S rRNA 또는 그 염기서열의 비교를 통하여 이루어졌다. 이는 16S rRNA 유전자가 중간에 매우 보존적이면서도 다양성을 가지고 있다는 사실에 근거한다 (Stahl, D. A., 및 J. W. Urbance. The division between fast and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. J. Bacteriol. 172: 116 - 124(1990); Rogall, T., J. Wolters, T. Flohr 및 E. C. Bottger. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. Int. J. Syst. Bacteriol. 40: 323 - 330(1990b); Rogall T., T. Flohr, 및 E. C. Bottger. Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. J. Gen. Microbiol. 136(Pt 9): 1915 - 1920(1990a)). 그러나, 16S rRNA 유전자는 일부 종 간의 염기서열 유사성을 가지고 있기 때문에 균종 감별에 어느 정도의 한계점을 가지고 있다 (Fox, G. E., J. D. Wisotzkey, 및 P. J. Jurtshumk. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 166 - 170(1992)).

또한, IS6110 삽입 유전자(insertion element)도 TB complex(*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. magerit*)에서 다수의 복제수로 존재하므로 이를 표적으로 한 PCR 탐지법도 사용되고 있으나, 이 삽입 유전자를 갖지 않는 결핵균이 보고되어 위음성의 결과가 나타날 수도 있다는 것이 보고되었다 (Yuen L. K., B. C. Ross, K. M. Jackson 및 B. Dwyer. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. J. Clin. Microbiol. 31: 1615 - 1618(1993)). 이 유전자를 증폭시키는 프라이머는 현재 국내에서도 상용화되어 있지만 (TB-PCR, TB Detection Kit, (주)바이오니아, 대한민국), 이들은 매우 한정적인 균종에만 국한된 것으로 TB 복합체의 존재만을 탐지하는 PCR 키트이다.

결핵균을 제외한 비결핵균(NTM)들에 의한 감염 예가 증가하고, 비결핵균 중에서도 이전에는 알려지지 않았던 새로운 균종에 의한 인체감염증이 계속 나타남에 따라, 이들의 예방과 치료에 우선적으로 요구되는 질환 유발 균종을 정확히 규명하기 위하여, 각 균종에 특이적인 유전자상의 차이를 나타내는 새로운 동정 및 진단 방법의 개발이 절실히 요구되고 있다.

#### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은, 최소한의 프라이머를 사용하여 1 회의 PCR에 의해 2 종 이상의 표적 유전자를 증폭시킬 수 있는 신규한 멀티플렉스 PCR 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은, 최소한의 프라이머를 사용하여 1 회의 PCR에 의해 마이코박테리아의 속인지를 검정하고 결핵균과 비결핵균(NTM)을 동시에 검출하기 위한 신규한 멀티플렉스 PCR 기법에 사용할 수 있는 키트(kit)를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 신규한 멀티플렉스 PCR에 적용하여, 마이코박테리아 속의 검정 및 결핵균과 비결핵균(NTM)을 동시에 검출하기 위한 PCR용 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 제공하는 것이다.

상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 멀티플렉스 PCR 방법은, 증폭하고자 하는 2 종 이상의 표적 유전자에서 공통적인 염기서열을 갖는 1 개 이상의 올리고뉴클레오타이드를 고정 프라이머로 하고, 표적 유전자에서 특이적인 염기서열을 갖는 2 종 이상의 올리고뉴클레오타이드를 특이적 프라이머로 하여, 상기 고정 프라이머와 특이적 프라이머를 하나의 용기 내에서 동시에 반응시켜 2 종 이상의 표적 유전자를 증폭시키는 것을 특징으로 한다.

상기 다른 목적을 달성하기 위한 본 발명의 멀티플렉스 PCR용 키트는, 증폭하고자 하는 2 종 이상의 표적 유전자에서 공통적인 염기서열을 갖는 1 개 이상의 올리고뉴클레오타이드로 되는 고정 프라이머, 및 표적 유전자에서 특이적인 염기서열을 갖는 2 종 이상의 올리고뉴클레오타이드로 되는 특이적 프라이머를 포함하고, 상기 고정 프라이머와 특이적 프라이머가 하나의 용기 내에서 동시에 반응하도록 된 것을 특징으로 한다.

여기에서, 고정 프라이머는 마이코박테리아 속에 공통적인 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고, 특이적 프라이머는 마이코박테리아 각각의 균종에 특이적인 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드 프라이머인 멀티플렉스 PCR용 키트는 마이코박테리아 동정을 위한 것으로 바람직하다.

상기 또 다른 목적을 달성하기 위한 본 발명의 PCR용 프라이머는, 서열 번호 1의 마이코박테리아 속 검출용 올리고뉴클레오타이드, 서열 번호 3의 결핵균(*M. tuberculosis*) 검출용 올리고뉴클레오타이드, 서열 번호 4의 비결핵균인 마이코박테리움 포퓰리툼(*M. fortuitum*) 검출용 올리고뉴클레오타이드, 서열 번호 5의 비결핵균인 마이코박테리움 플라베센스(*M. flavescens*) 검출용 올리고뉴클레오타이드, 및 서열 번호 6의 비결핵균인 마이코박테리움 아비움(*M. avium*) 검출용 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 한다.

본 발명에서는 마이코박테리아의 속 특이적(genus-specific) 염기서열과 균종 특이적(species-specific) 염기서열을 포함하고 있는 16S rRNA와 23S rRNA 사이의 ITS(interanal transcribed spacer) 염기서열 부분을 표적으로 사용하는 멀티플렉스 PCR 기법에 의한 마이코박테리아 동정 및 진단 방법을 개발하였다.

즉, 마이코박테리아 유전자의 보존적인 염기서열(conserved sequence)과 다형성지역(polymorphic sequence)을 모두 포함하고 있는 16S rRNA와 23S rRNA 사이의 ITS에서 보존적인 염기서열을 갖는 속 특이적(genus-specific) 프라이머와 다형성지역의 염기서열을 갖는 균종 특이적(species-specific) 프라이머를 고안하여, 하나의 보존적인 염기서열 부분을 공통의 역위(reverse) 프라이머로 고정시키고, 4 개의 종 특이적 프라이머를 다른 하나의 속 특이적 프라이머와 함께 전위(forward) 프라이머로 조합시켜 각각 다른 크기의 PCR 산물을 얻도록 함으로써, 마이코박테리아 속을 검정하는 동시에, 마이코박테리아 중에서도 결핵균과 비결핵균(NTM) 4 균종을 검출할 수 있도록 하였다.

이들 프라이머는 이를 이용한 PCR 반응 산물을 겔 상에서 쉽게 구별할 수 있도록, 그리고 서로 반응산물의 크기가 다르게 나올 수 있도록 고안하였으며, 6 개의 프라이머 모두를 1 회의 PCR 반응에 동시에 적용하여 1 회의 PCR 수행으로 마이코박테리아 속을 검정하고 결핵균과 비결핵균(NTM) 4 균종을 동시에 검출할 수 있게 된다.

일반적으로 하나의 균종을 검출하는 PCR에는 1 쌍의 프라이머가 이용되며, 따라서 5 종류의 표적(target)을 목적으로 PCR을 수행하기 위해서는 5 쌍, 즉 10 개의 프라이머가 필요하고 5 회의 PCR 반응을 수행하여야 하고, 멀티플렉스 PCR에서도 반응 횟수만 줄 뿐 프라이머 갯수는 동일하다. 본 발명자들은 이와 같은 점을 고려하여, 최소한으로 프라이머 수를 줄일 수 있도록 연구를 하여 왔으며, 나아가 1 회의 PCR에 동시에 적용할 수 있도록 공통의 반응조건을 갖는 프라이머 개발에 주력하여 왔다. 그 결과, 6 개의 프라이머만을 이용하고 이들을 PCR 반응에 동시에 적용하여 1 회의 PCR 수행으로 마이코박테리아 속을 검정하는 동시에, 결핵균과 비결핵균(NTM) 4 균종을 한꺼번에 검출할 수 있게 된 것이다.

본 발명에 따른 PCR용 프라이머는 마이코박테리아의 ITS(internal transcribed spacer) 부분의 염기서열을 기초로 하여 합성된 것이다. 마이코박테리아 속을 검정하는 동시에 결핵균과 비결핵균(NTM)을 한꺼번에 검출하기 위한 PCR 기법은 6 개의 프라이머 - 종 특이적(species - specific) 전위 프라이머와 공통의 속 특이적(genus - specific) 역위 프라이머 -를 이용하게 되는데, 이들 프라이머를 설계할 때는 프라이머의 A, G, C, T 함량비, 프라이머의 복합체(dimer) 형성 방지, 같은 염기서열의 3 회 이상 반복 금지 등 여러 가지 제약이 수반되며, 그 외에도 PCR 반응 조건에 있어서 주형(template) DNA 양, 프라이머의 농도, dNTP의 농도, Mg<sup>2+</sup>의 농도, 반응 온도, 반응 시간 등의 조건이 적정해야 한다.

본 발명에서와 같이 마이코박테리아의 속을 검정하고 결핵균과 비결핵균(NTM)을 동시에 검출하기 위한 프라이머를 혼합하여 1 회의 PCR을 동시에 수행함으로써 분리한 각 균종의 유전자를 1 회에 확인하는 멀티플렉스 PCR 반응에서는, 프라이머 설계시 단독 PCR의 경우와 같은 조건이 더욱 엄격하게 고려되어야 한다. 그리고, 반응 후 겔 상에서 증폭된 유전자 산물의 뚜렷한 구별을 위해서는 유전자 산물의 크기가 다르도록 프라이머를 고안하여야 한다는 제약까지 수반된다.

본 발명에 의해 제공되는 마이코박테리아 속의 검정 및 결핵균과 비결핵균(NTM) 4 균종의 검출을 위한 6 개의 프라이머들은 이러한 멀티플렉스 PCR 기법에 적합하도록 개발된 것으로서, 1 회의 PCR 반응에 동시에 적용할 수 있어 1 회의 PCR 수행으로 마이코박테리아 속을 검정하고 동시에 결핵균과 비결핵균(NTM)을 고감도로 검출할 수 있다. 본 발명에서 개발된 PCR용 프라이머 및 이들에 의한 PCR 증폭 산물의 크기는 다음과 같다.

[표 1]

균주명	전위 프라이머	역위 프라이머	증폭 산물의 크기
Mycobacteria 속	ITSF: 서열 번호 2	MYC6:서열 번호 1	종마다 약간씩 차이
<i>M. tuberculosis</i>	MTB10: 서열 번호 3		139 bp
<i>M. fortuitum</i>	FOR12: 서열 번호 4		206 bp
<i>M. flavescens</i>	FLA9: 서열 번호 5		277 bp
<i>M. avium</i>	MAC5: 서열 번호 6		78 bp

여기에서 MYC6는 공통적으로 사용되는 역위 프라이머로서, 마이코박테리아 속에 보존적인 염기서열로 고안한 공통의 역위 프라이머이다. 그리고 마이코박테리아 속의 검정에 사용되는 전위 프라이머 ITSF는 16S RNA 부분의 보존적 염기서열을 갖는다.

도 1은 본 발명의 멀티플렉스 PCR에 의한 증폭 산물의 지도와 증폭에 이용되는 프라이머의 위치를 나타내는 개요도이다.

이하, 실시예를 기초로 하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 단, 이들 실시예는 본 발명의 예시일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 제한되는 것은 아니다.

실시에 1: 마이코박테리아 표준 균주의 배양 및 게놈 DNA 분리

마이코박테리아 표준 균주는 유전자은행(Korean Collection for Type Culture, KCTC)과 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 확보하였으며, 이들의 DNA를 추출하기 위해서는 인스탄진 매트릭스(InstaGene matrix, Bio - Rad Co.)를 사용하였다.

1.5 ml 튜브에 인스탄진 매트릭스 200  $\mu$ l를 가하였다. 그리고, 본 실험에 사용할 균주를 고체 배지(Ogawa 배지)에서 배양한 후 1 백금이를 따서 인스탄진 매트릭스가 들어 있는 튜브에 넣어 부유시켰다. 이것을 56 °C에서 30 분 동안 반응시킨 후 10 초 동안 잘 혼합되도록 섞고, 다시 100 °C에서 8 분 동안 열처리한 후 10 초 동안 잘 섞었다. 혼합물을 12,000 rpm에서 3 분 동안 원심분리하여 분리된 상층액을 PCR 반응의 주형 DNA로 사용하였다.

사용된 표준 균주는 다음과 같다:

마이코박테리움 투베르쿨로시스 (*M. tuberculosis*) H37Rv (ATCC 27294)

마이코박테리움 포튜이툼 (*M. fortuitum*) (ATCC 6841)

마이코박테리움 플라베센스 (*M. flavescence*) (ATCC 14474)

마이코박테리움 아비움 (*M. avium*) (ATCC 25291)

마이코박테리움 칸사시 (*M. kansasii*) (ATCC 12478)

마이코박테리움 첼로네 (*M. chelonae*) (ATCC 35752)

마이코박테리움 스줄가이 (*M. szulgai*) (ATCC 35799)

## 실시예 2: PCR용 프라이머 및 프로브 제조

### ①마이코박테리아 속 동정을 위한 프라이머 및 프로브 제조

다른 병원성 미생물에 대해서는 반응하지 않고 마이코박테리아 속만을 증폭시키는 프라이머로서는, 모든 마이코박테리아에 존재하는 보존적인 염기서열을 선택하여, 전위 프라이머로서 서열 번호 2의 ITSf, 역위 프라이머로서는 서열 번호 1의 MYC6를 통상의 방법에 따라 제조하였다.

### ②결핵균 동정을 위한 프라이머 및 프로브 제조

마이코박테리아 속 중에서도 결핵균만을 특이적으로 증폭시키는 프라이머로서는, 결핵균과 NTM의 ITS 부분의 염기서열을 근거로 하여 전위 프라이머로서 서열 번호 3의 MTB10, 역위 프라이머로서는 서열 번호 1의 MYC6를 통상의 방법에 따라 제조하였다.

### ③비결핵균 동정을 위한 프라이머 및 프로브 제조

NTM 각각의 균에 특이적으로 반응하고, 또한 반응이 끝난 후 겔 상에서 쉽게 구분이 될 수 있도록 반응 산물을 각각 다른 크기로 증폭시키는 프라이머로서는, NTM의 ITS 부분의 염기서열을 근거로 하여 전위 프라이머로서 서열 번호 4, 5 및 6의 FOR12, FLA9, 및 MAC5, 역위 프라이머로서는 서열 번호 1의 MYC6를 통상의 방법에 따라 제조하였다.

## 실시예 3: 제조된 프라이머에 대한 특이성 시험

마이코박테리아 표준 균주에 대하여 본 발명의 멀티플렉스 PCR 기법을 수행하기 전에, 각각의 프라이머를 이용하여 단독 PCR을 실시하였다. 또한, 이들 4 종의 균주 이외의 다른 균주에 대해서도 같은 PCR 기법을 실시하였다. 반응 조건은 충분히 변성시키기 위해 94℃에서 5분간 열처리한 후 94℃에서 1분, 64℃에서 1분, 72℃에서 1분씩 40회 반응시킨 후, 마지막으로 72℃에서 10분간 연장하였다. 반응 후 3% 아가로스 겔을 이용하여 전기영동을 실시하였다.

도 2는 마이코박테리아 속에만 특이적으로 존재하는 염기서열의 프라이머 ITSf와 MYC6를 사용하여 PCR을 실시한 후 전기영동한 사진으로, M 레인은 100 bp 분자량 표지이고, C 레인은 증류수(음성 대조군), 1 레인은 마이코박테리움 투베르쿨로시스 (*M. tuberculosis*), 2 레인은 마이코박테리움 플라베센스 (*M. flavescence*), 3 레인은 마이코박테리움 아비움 (*M. avium*), 4 레인은 마이코박테리움 포튜이툼 (*M. fortuitum*), 5 레인은 마이코박테리움 칸사시 (*M. kansasii*), 6 레인은 마이코박테리움 첼로네 (*M. chelonae*), 그리고 7 레인은 마이코박테리움 스줄가이 (*M. szulgai*)를 나타낸다. 여기에서 보듯이, 프라이머 ITSf와 MYC6를 사용한 PCR에서는 마이코박테리아 속의 미생물만이 증폭되는 것을 알 수 있다.

도 3은 마이코박테리아 각 균종마다 특이하게 존재하는 염기서열의 균주 특이적인 프라이머 MTB10, FOR12, FLA9 및 MAC5를 사용하여 PCR을 실시한 후 전기영동한 사진으로, A는 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*M. tuberculosis*), B는 마이코박테리움 플라베센스(*M. flavescence*), C는 마이코박테리움 아비움(*M. avium*), 그리고 D는 마이코박테리움 포투이트움(*M. fortuitum*)의 경우이다. M은 100 bp 분자량 표지이고, C 레인은 중류수(음성 대조군), 1 레인은 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*M. tuberculosis*), 2 레인은 마이코박테리움 플라베센스(*M. flavescence*), 3 레인은 마이코박테리움 아비움(*M. avium*), 4 레인은 마이코박테리움 포투이트움(*M. fortuitum*), 5 레인은 마이코박테리움 칸사시(*M. kansasii*), 6 레인은 마이코박테리움 첼로네(*M. chelonae*), 그리고 7 레인은 마이코박테리움 스줄가이(*M. szulgai*)를 나타낸다. 여기에서 보면, A의 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*M. tuberculosis*)는 1 레인에서만, B의 마이코박테리움 플라베센스(*M. flavescence*)는 2 레인에서만, C의 마이코박테리움 아비움(*M. avium*)은 3 레인에서만, 그리고 D의 마이코박테리움 포투이트움(*M. fortuitum*)은 4 레인에서만 증폭이 일어난 것을 알 수 있다.

실시예 4: 표준 균주를 이용한 멀티플렉스 PCR 시험

본 발명의 프라이머 ITSf, MTB10, FOR12, FLA9, MAC5 및 MYC6를 사용하여, 결핵균 및 6 종의 비결핵균(NTM)에 대하여 멀티플렉스 PCR 기법을 수행하였다. PCR 반응물의 조성은 다음과 같다: 500 mM KCl, 100 mM 트리스 HCl(pH 9.0), 1% 트리톤 X-100, 2.5 mM dNTP(dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq DNA 폴리머라제, PCR 촉진제(enhancer), 그리고 각 균종에 특이적인 전위 프라이머는 10 pmol, 공동적으로 들어가는 역위 프라이머는 30 pmol씩 사용하였다. 반응 혼합물을 충분히 변성시키기 위해 94 °C에서 5 분간 열처리한 후 94 °C에서 1 분, 64 °C에서 1 분, 72 °C에서 1 분씩 40 회 반응시킨 후, 마지막으로 72 °C에서 10 분간 연장하였다. 반응 후 3 % 아가로스 젤을 이용하여 전기영동을 실시하였다.

도 4는 본 발명의 프라이머 ITSf, MTB10, FOR12, FLA9, MAC5 및 MYC6를 사용하여, 결핵균 및 6 종의 비결핵균(NTM)에 대하여 멀티플렉스 PCR 기법을 실시한 후 전기영동한 사진으로, M 레인은 100 bp 분자량 표지, C 레인은 중류수(음성 대조군), 1 레인은 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*M. tuberculosis*), 2 레인은 마이코박테리움 플라베센스(*M. flavescence*), 3 레인은 마이코박테리움 아비움(*M. avium*), 4 레인은 마이코박테리움 포투이트움(*M. fortuitum*), 5 레인은 마이코박테리움 칸사시(*M. kansasii*), 6 레인은 마이코박테리움 첼로네(*M. chelonae*), 그리고 7 레인은 마이코박테리움 스줄가이(*M. szulgai*)를 나타낸다. 여기에서 보면, 레인 1 내지 7 모두에서 마이코박테리아 속에 해당하는 증폭이 있고, 결핵균(*M. tuberculosis*)은 레인 1에서, 마이코박테리움 플라베센스(*M. flavescence*)는 레인 2에서, 마이코박테리움 아비움(*M. avium*)은 레인 3에서, 그리고 마이코박테리움 포투이트움(*M. fortuitum*)은 레인 4에서 증폭이 있는 것을 볼 수 있다. 비결핵균 중에서 마이코박테리움 칸사시(*M. kansasii*), 마이코박테리움 첼로네(*M. chelonae*), 그리고 마이코박테리움 스줄가이(*M. szulgai*)는 마이코박테리아 속에 해당하는 증폭 만이 있는 것을 확인할 수 있다.

도 5는 도 4의 전기영동 사진을 도식화한 것으로, 1, 3, 5, 7, 9, 10 및 11은 마이코박테리아 속 공통의 프라이머쌍(ITSf-MYC6)에 의한 PCR 증폭 산물, 2는 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*M. tuberculosis*) 특이적 프라이머쌍(MTB10-MYC6)에 의한 PCR 증폭 산물, 4는 마이코박테리움 플라베센스(*M. flavescence*) 특이적 프라이머쌍(FLA9-MYC6)에 의한 PCR 증폭 산물, 6은 마이코박테리움 아비움(*M. avium*) 특이적 프라이머쌍(MAC5-MYC6)에 의한 PCR 증폭 산물, 그리고 8은 마이코박테리움 포투이트움(*M. fortuitum*) 특이적 프라이머쌍(FOR12-MYC6)에 의한 PCR 증폭 산물을 나타낸다.

도 4 및 도 5에서 보듯이, 하나의 튜브에 여러 프라이머를 동시에 혼합한 상태에서도 각 균종에 특이적으로 증폭이 일어난다는 것을 확인할 수 있다.

즉, 본 발명에 따른 각 균종에 대한 프라이머들은 공통의 PCR 조건을 갖고 있기 때문에 1 회의 PCR 반응에 동시 적용하는 것이 가능하며, 따라서, 이들 6 개 프라이머를 동시에 이용하는 본 발명의 멀티플렉스 PCR 기법에 따르면 단 1 회의 PCR을 수행함으로써 결핵균과 비결핵균을 동정할 수 있다.

본 발명에서는 한 종류의 공통적인 프라이머를 고정시키고, 속 특이적인 프라이머와 종 특이적인 프라이머 5 종을 사용하여 하나의 시험관 내에서 1 회의 PCR을 시행하여 여러 균종을 동정하는 펜타-멀티플렉스(penta-multiplex) PCR 기법을 예를 들어 설명하였지만, 이밖에도 디(di)-, 트리(tri)-, 테트라(tetra)-멀티플렉스 PCR 뿐 아니라 헥사(hexa)-멀티플렉스 PCR을 포함하여 모든 종류의 멀티플렉스 PCR도 가능하며, 이 또한 본 발명의 범위에 들어갈 것이다.



이상에서 살펴 본 바와 같이, 본 발명의 프라이머들을 이용한 멀티플렉스 PCR 기법은, 하나의 시험관에서 최소한의 프라이머를 사용하여 단 1 회의 PCR 수행으로 마이코박테리아 속 여부를 검정하고, 결핵균과 비결핵균 4 종을 동시에 검출할 수 있으며, 다른 생화학적 시험을 거치지 않고 신속하고 정확하게 진단할 수 있어, 비용 면에서도 매우 경제적이다. 또한, 본 발명에 따른 멀티플렉스 PCR 기법은 특히 2 종 이상의 균종을 포함한 균주에 대해서도 1 회에 확인이 가능하므로 결핵 감염의 진단에 효과적으로 활용될 수 있으며, 그 밖의 비결핵균(NTM)을 검출하는 데에 효과적이면서도 경제적으로 사용될 수 있을 것이다.

#### (57) 청구의 범위

##### 청구항 1.

증폭하고자 하는 2 종 이상의 표적 유전자에서 공통적인 염기서열을 갖는 1 개 이상의 올리고뉴클레오타이드를 고정 프라이머로 하고, 표적 유전자에서 특이적인 염기서열을 갖는 2 종 이상의 올리고뉴클레오타이드를 특이적 프라이머로 하여, 상기 고정 프라이머와 특이적 프라이머를 하나의 용기 내에서 동시에 반응시켜 2 종 이상의 표적 유전자를 증폭시키는 것을 특징으로 하는 멀티플렉스 PCR 방법.

##### 청구항 2.

제 1 항에 있어서, 고정 프라이머가 1 개이고, 특이적 프라이머가 2 내지 6 개의 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

##### 청구항 3.

증폭하고자 하는 2 종 이상의 표적 유전자에서 공통적인 염기서열을 갖는 1 개 이상의 올리고뉴클레오타이드로 되는 고정 프라이머, 및 표적 유전자에서 특이적인 염기서열을 갖는 2 종 이상의 올리고뉴클레오타이드로 되는 특이적 프라이머를 포함하고, 상기 고정 프라이머와 특이적 프라이머가 하나의 용기 내에서 동시에 반응하도록 된 동정 및 진단을 위한 멀티플렉스 PCR용 키트.

##### 청구항 4.

제 3 항에 있어서, 고정 프라이머는 마이코박테리아 속에 공통적인 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드 프라이머이고, 특이적 프라이머는 마이코박테리아 각각의 균종에 특이적인 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드 프라이머인 것을 특징으로 하는, 마이코박테리아 동정 및 진단을 위한 멀티플렉스 PCR용 키트.

##### 청구항 5.

제 3 항에 있어서, 고정 프라이머는 서열 번호 1의 올리고뉴클레오타이드이고, 특이적 프라이머는 서열 번호 2 내지 6의 적어도 2 종인 것을 특징으로 하는, 마이코박테리아 동정 및 진단을 위한 멀티플렉스 PCR용 키트.

##### 청구항 6.

서열 번호 1의 마이코박테리아 속 검출용 올리고뉴클레오타이드.

##### 청구항 7.

서열 번호 3의 결핵균(*M. tuberculosis*) 검출용 올리고뉴클레오타이드.

청구항 8.

서열 번호 4의 비결핵균인 마이코박테리움 포튜이툼(*M. fortuitum*) 검출용 올리고뉴클레오티드.

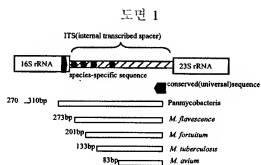
청구항 9.

서열 번호 5의 비결핵균인 마이코박테리움 플라베센스(*M. flavescens*) 검출용 올리고뉴클레오티드.

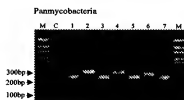
청구항 10.

서열 번호 6의 비결핵균인 마이코박테리움 아비움(*M. avium*) 검출용 올리고뉴클레오티드.

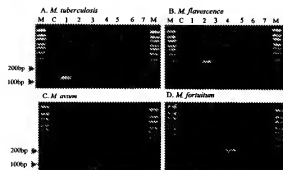
도면



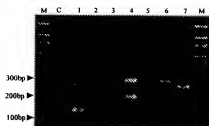
도면 2



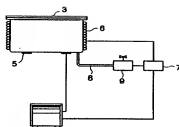
도면 3



도면 4



도면 5



<110> KIM, Jeong Joon; SJ HIGHTECH Co., Ltd.

KIM, Cheol Min

PARK, Hee Kyung

<120> MULTIPLEX PCR, KIT AND OLIGONUCLEOTIDE FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF MYCOBACTERIA USING MULTIPLEX PCR

<130> ppa90809

<160> 6

<170> KOPATIN 1.5

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for detection of Mycobacteria

<400> 1

gagagtttga tagtggttgc gagcatcgag

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for detection of Mycobacteria sp.

<400> 2

tggatccgac gaagtcgtaa caagg	25
<210> 3	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer for detection of <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
<400> 3	
gagccgggtg catgacaaca aagttggcca	30
<210> 4	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer for detection of <i>Mycobacterium fortuitum</i>	
<400> 4	
ccgagccgtg aggaaccggt tgcctgtagt	30
<210> 5	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer for detection of <i>Mycobacterium flavescens</i>	
<400> 5	
aaggagcacc atttattggt cccccgtccc	30
<210> 6	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer for detection of <i>Mycobacterium avium</i>	
<400> 6	
tgagacaaca ctcggtccat ccgtgtggag	30